

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

2002年10月29日

Date of Application:

願番号

特願2002-314333

Application Number:

条約による外国への出願
に優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願

country code and number

our priority application,
used for filing abroad

the Paris Convention, is

願人

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
株式会社モリタックス

licant(s):

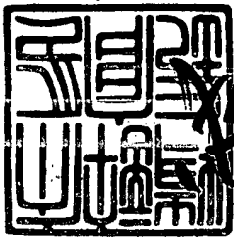
J P 2002-314333

BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT


2006年 7月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office



中嶋

出証番号 出証特2006-3025098



【書類名】 特許願

【整理番号】 MT20CT01

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野南 1 - 3 - 3 株式会社
モリテックス ナノテクノロジー研究所内

【氏名】 堀尾 浩司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区根津 1 - 2 3 - 9 プレジデントハイツ 7
1 1

【氏名】 鷺津 正夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区一ツ家 3 丁目 2 5 - 1 9 シャルマンドミ
ール 2 0 5

【氏名】 黒澤 修

【特許出願人】

【識別番号】 000195568

【氏名又は名称】 生物系特定産業技術研究推進機構

【特許出願人】

【識別番号】 000138200

【氏名又は名称】 株式会社モリテックス

【代表者】 森戸 祐幸

【代理人】

【識別番号】 100071102

【弁理士】

【氏名又は名称】 三觜 晃司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013332

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 塩基配列解析方法及び装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 1 の基板の表面に塩基配列解析試料固定用の薄膜を形成して、この薄膜上に塩基配列解析試料を伸長して固定し、この状態で塩基配列解析試料を酵素により切断して断片化した後、所望の部位の薄膜を加熱手段により加熱して気化させることにより、所望の部位の塩基配列解析試料の断片を第 1 の基板表面から飛ばして、この第 1 の基板の表面側に対向して配置した第 2 の基板表面に捕捉し、この状態で塩基配列を解析することを特徴とする塩基配列解析方法

【請求項 2】 第 1 の基板の表面に、加熱により気化する材料を含むアブレーション層を介して塩基配列解析試料固定用の薄膜を形成して、この薄膜上に塩基配列解析試料を伸長して固定し、この状態で塩基配列解析試料を酵素により切断して断片化した後、所望の部位のアブレーション層を加熱手段により加熱して気化させることにより、所望の部位の塩基配列解析試料の断片を第 1 の基板表面から飛ばして、この第 1 の基板の表面側に対向して配置した第 2 の基板表面に捕捉し、この状態で塩基配列を解析することを特徴とする塩基配列解析方法

【請求項 3】 請求項 1 又は請求項 2 の塩基配列解析を、伸長して固定した塩基配列解析試料の一端側から他端側に対応して順次行って塩基配列解析試料の全塩基配列を解析することを特徴とする塩基配列解析方法

【請求項 4】 塩基配列解析試料固定用の薄膜は高分子ゲルとすることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 5】 塩基配列解析試料固定用の薄膜は微細ピッチの凹凸を形成した薄膜とすることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 6】 薄膜の材料はポリメタクリル酸メチル（PMMA）であることを特徴とする請求項 5 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 7】 ピッチは $0.1\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ の範囲とすることを特徴とする請求項 5 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 8】 加熱手段は、第 1 の基板の裏面からのレーザ光照射であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の塩基配列解析方法



【請求項 9】 加熱手段は、第 1 の基板に予め形成した通電加熱体であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 10】 アブレーション層の、加熱により気化する材料はプラスチックとしたことを特徴とする請求項 2 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 11】 第 1 の基板の裏面からのレーザ光照射を加熱手段とする場合において、アブレーション層には、加熱により気化する材料に加えて、ビーム吸収性の材料を含ませることを特徴とする請求項 2 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 12】 ビーム吸収性の材料はカーボンとしたことを特徴とする請求項 11 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 13】 ビーム吸収性の材料は、加熱により気化する材料と第 1 の基板の間に蒸着することを特徴とする請求項 11 又は 12 に記載の塩基配列解析方法

【請求項 14】 塩基配列解析試料を伸長して固定する塩基配列解析試料固定用の薄膜を表面に形成した第 1 の基板と、上記薄膜の所望部位を加熱して気化させる加熱手段と、第 1 の基板の表面側に対向させて配置する第 2 の基板とから構成した塩基配列解析装置

【請求項 15】 塩基配列解析試料を伸長して固定する塩基配列解析試料固定用の薄膜を、加熱により気化する材料を含むアブレーション層を介して表面に形成した第 1 の基板と、上記アブレーション層の所望部位を加熱して気化させる加熱手段と、第 1 の基板の表面側に対向させて配置する第 2 の基板とから構成した塩基配列解析装置

【請求項 16】 塩基配列解析試料固定用の薄膜は高分子ゲルとすることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 17】 塩基配列解析試料固定用の薄膜は微細ピッチの凹凸を形成した薄膜とすることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 18】 薄膜の材料はポリメタクリル酸メチル (PMMA) であることを特徴とする請求項 17 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 19】 ピッチは $0.1\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ の範囲とすることを特徴とする請求項 17 に記載の塩基配列解析装置



【請求項 20】 加熱手段は、第 1 の基板の裏面からのレーザ光照射であることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 21】 加熱手段は、第 1 の基板に予め形成した通電加熱体であることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 22】 アブレーション層の、加熱により気化する材料はプラスチックとしたことを特徴とする請求項 15 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 23】 アブレーション層には、加熱により気化する材料に加えて、ビーム吸収性の材料を含ませることを特徴とする請求項 15 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 24】 ビーム吸収性の材料はカーボンとしたことを特徴とする請求項 23 に記載の塩基配列解析装置

【請求項 25】 ビーム吸収性の材料は、加熱により気化する材料と第 1 の基板の間に蒸着することを特徴とする請求項 23 又は 24 に記載の塩基配列解析装置

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA や RNA の塩基配列解析方法及び装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

一般に、DNA 等の塩基配列解析試料の塩基配列を解析する従来の塩基配列解析装置では、一時に解析可能な塩基対の数は数百～千である。従って、一般にこのような塩基対よりも遥かに長い塩基配列解析試料を解析する場合には、塩基配列解析試料を、まず水溶液中で制限酵素により切断して断片化し、その後に上記塩基配列解析装置を用いて解析することになる。

【0003】

このように DNA 等の塩基配列解析試料を水溶液中で制限酵素により断片化する方法では、解析した塩基配列解析試料断片が、元の塩基配列解析試料のどの位置にあったものであるかが分からなくなってしまうという欠点がある。

**【0004】**

このため従来は、何種類もの制限酵素を使用して形成した各断片を解析して、得られた解析結果をつなぎ合わせて全体の塩基配列を推定しているが、このような方法では、何種類もの制限酵素を用いて行う解析自体が多大な労力とコストを必要とすることに加えて、解析結果をつなぎ合わせて全体の配列を推定することにも多大な労力が必要であるという欠点がある。この欠点は、解析対象のDNA等の塩基配列解析試料が長くなるほど顕著になる。

【0005】

この欠点を解決するために、例えば特許第3282679号の発明では、DNAを伸長し配列して基板上に固定し、一端より数百～千の塩基対毎に順次断片に切断して回収し、各々の断片を解析した後、解析結果をつなぎ合わせることで、元のDNAの全塩基配列を決定する方法が提案されている。

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

このような方法を適用するためには、塩基配列を損なうことなく効率良くDNA等の塩基配列解析試料を切断して断片を回収する手法が必要になる。

そこで本発明では、DNA等の塩基配列解析試料の切断回収を効率的に行うことができる方法と装置を提供することを目的とする。

【0007】**【課題を解決するための手段】**

上述した課題を解決するために、まず請求項1の発明では、第1の基板の表面に塩基配列解析試料固定用の薄膜を形成して、この薄膜上に塩基配列解析試料を伸長して固定し、この状態で塩基配列解析試料を酵素により切断して断片化した後、所望の部位の薄膜を加熱手段により加熱して気化させることにより、所望の部位の塩基配列解析試料の断片を第1の基板表面から飛ばして、この第1の基板の表面側に対向して配置した第2の基板表面に捕捉し、この状態で塩基配列を解析する塩基配列解析方法を提案する。

【0008】

次に請求項2の発明では、第1の基板の表面に、加熱により気化する材料を含



むアブレーション層を介して塩基配列解析試料固定用の薄膜を形成して、この薄膜上に塩基配列解析試料を伸長して固定し、この状態で塩基配列解析試料を酵素により切断して断片化した後、所望の部位のアブレーション層を加熱手段により加熱して気化させることにより、所望の部位の塩基配列解析試料の断片を第1の基板表面から飛ばして、この第1の基板の表面側に対向して配置した第2の基板表面に捕捉し、この状態で塩基配列を解析する塩基配列解析方法を提案する。

【0009】

次に請求項3の発明では、上記請求項1又は請求項2の塩基配列解析を、伸長して固定した塩基配列解析試料の一端側から他端側に対応して順次行って塩基配列解析試料の全塩基配列を解析する塩基配列解析方法を提案する。

【0010】

次に請求項4の発明では、請求項1又は2の方法において、塩基配列解析試料固定用の薄膜は高分子ゲルとすることを提案する。

【0011】

次に請求項5の発明では、請求項1又は2の方法において、塩基配列解析試料固定用の薄膜は微細ピッチの凹凸を形成した薄膜とすることを提案する。

【0012】

次に請求項6の発明では、請求項5の方法において、薄膜の材料はポリメタクリル酸メチル（PMMA）であることを提案する。

【0013】

次に請求項7の発明では、請求項5の方法において、ピッチは $0.1\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ の範囲とすることを提案する。

【0014】

次に請求項8の発明では、請求項1又は2の発明において、加熱手段は、第1の基板の裏面からのレーザ光照射とすることを提案する。

【0015】

次に請求項9の発明では、請求項1又は2の発明において、加熱手段は、第1の基板に予め形成した通電加熱体であることを提案する。

【0016】



次に請求項 10 の発明では、請求項 2 の発明において、アブレーション層の、加熱により気化する材料はプラスチックとすることを提案する。

【0017】

次に請求項 11 の発明では、請求項 2 の方法において、第 1 の基板の裏面からのレーザ光照射を加熱手段とする場合、アブレーション層には、加熱により気化する材料に加えて、ビーム吸収性の材料を含ませることを提案する。

【0018】

次に請求項 12 の発明では、請求項 11 の方法において、ビーム吸収性の材料はカーボンとすることを提案するものである。

【0019】

次に請求項 13 の発明では、請求項 11 又は 12 の方法において、ビーム吸収性の材料は、加熱により気化する材料と第 1 の基板の間に蒸着することを提案する。

【0020】

次に請求項 14 の発明では、塩基配列解析試料を伸長して固定する塩基配列解析試料固定用の薄膜を表面に形成した第 1 の基板と、上記薄膜の所望部位を加熱して気化させる加熱手段と、第 1 の基板の表面側に対向させて配置する第 2 の基板とから構成した塩基配列解析装置を提案する。

【0021】


次に請求項 15 の発明では、塩基配列解析試料を伸長して固定する塩基配列解析試料固定用の薄膜を、加熱により気化する材料を含むアブレーション層を介して表面に形成した第 1 の基板と、上記アブレーション層の所望部位を加熱して気化させる加熱手段と、第 1 の基板の表面側に対向させて配置する第 2 の基板とから構成した塩基配列解析装置を提案する。

【0022】

次に請求項 16 の発明では、請求項 14 又は 15 の装置において、塩基配列解析試料固定用の薄膜は高分子ゲルとすることを提案する。

【0023】

次に請求項 17 の発明では、請求項 14 又は 15 の装置において、塩基配列解



析試料固定用の薄膜は微細ピッチの凹凸を形成した薄膜とすることを提案する。

【0024】

次に請求項18の発明では、請求項17の装置において、薄膜の材料はポリメタクリル酸メチル（PMMA）とすることを提案する。

【0025】

次に請求項19の発明では、請求項18の装置において、ピッチは $0.1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の範囲とすることを提案する。

【0026】

次に請求項20の発明では、請求項14又は15の装置において、加熱手段は、第1の基板の裏面からのレーザ光照射とすることを提案する。

【0027】

次に請求項21の発明では、請求項14又は15の装置において、加熱手段は、第1の基板に予め形成した通電加熱体とすることを提案する。

【0028】

次に請求項22の発明では、請求項15の装置において、アブレーション層の、加熱により気化する材料はプラスチックとすることを提案する。

【0029】

次に請求項23の発明では、請求項15の装置において、アブレーション層には、加熱により気化する材料に加えて、ビーム吸収性の材料を含ませることを提案する。

【0030】


次に請求項24の発明では、請求項23の装置において、ビーム吸収性の材料はカーボンとすることを提案する。

【0031】

次に請求項25の発明では、請求項23又は24の装置において、ビーム吸収性の材料は、加熱により気化する材料と第1の基板の間に蒸着することを提案する。

【0032】

本発明によれば、第1の基板の表面に形成した塩基配列解析試料固定用の薄膜



上にDNA等の塩基配列解析試料を伸長して固定し、この状態で酵素により塩基配列解析試料を切断するため、切断後の塩基配列解析試料の断片は薄膜上に固定状態であり、元の塩基配列解析試料上での並びが保存される。また切断は制限酵素により行うため、分子構造が明確な切断を行うことができる。

【0033】

そして、塩基配列解析試料固定用の薄膜又は薄膜と第1の基板との間に介在させたアブレーション層の所望部位を、レーザー照射や通電加熱体等の加熱手段により加熱して気化させることにより、その部位に対応する塩基配列解析試料の断片を飛ばして第2の基板表面に捕捉するので、所望の部位の塩基配列解析試料の断片を確実に回収して塩基配列の解析に供することができる。

【0034】

そして、このような解析を、伸長して固定用の薄膜に固定した塩基配列解析試料の一端側から他端側に対応して順次行うことにより、DNA等の塩基配列解析試料の全塩基配列を解析することができる。

【0035】

塩基配列解析試料を固定用の薄膜は、高分子ゲルとしたり、例えば $0.1\sim 10\mu\text{m}$ 以下という微細ピッチの凹凸を形成したPMMA等の材料の薄膜とすることにより、制限酵素による切断を阻害せず、そして切断後にも固定状態を維持することができる。


【0036】

【発明の実施の形態】

次に本発明の実施の形態を図1～図4を参照して説明する。

図1は第1の基板の表面にDNA等の塩基配列解析試料固定用の薄膜を形成して、この薄膜上に塩基配列解析試料を伸長して固定した状態を示す平面図、図2は図1の一部拡大A-A断面図である。また、図3、図4は動作の進行した状態を示す図1のA-A断面図である。

即ち、図において符号1は第1の基板であり、この第1の基板1は後述するようにレーザー光が透過する透光性の材質により構成している。この第1の基板1の表面にはアブレーション層2を介して塩基配列解析試料固定用の薄膜3を形成し



ている。アブレーション層 2 は、例えばポリエチレン、ポリメタクリル酸メチル又はポリカーボネート等の、加熱により気化するプラスチックにより構成している。また薄膜 3 は、ポリメタクリル酸メチル等の材料をフォトリソグラフィーやマイクロモールディング等の手段により加工して例えば $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲の適宜の微細ピッチの凹凸を形成した薄膜として構成している。

【0037】

以上の構成において、図 1、図 2 に示すように、薄膜 3 上に塩基配列解析試料の例としての DNA 4 を伸長して固定する。DNA 4 を伸長して薄膜 3 に固定する手法は、例えば特許第 3064001 号公報に記載されているように、溶液中の DNA を静電的に配向・伸長させ、溶液の流れにより付着させて固定する手法を適用する他、適宜の伸長・固定手法を適用することができる。

【0038】


このように薄膜 3 の微細ピッチの凹凸の凸部 5 に吸着されて固定されている DNA 4 に、DNA 切断酵素を作用させると、凸部 5 に吸着されている部位には酵素が作用しないため切断が生じないのに対して、凹部 6 に対応する DNA の部位には酵素が作用できるため DNA の切断が生じる。従って図 3 に示すように、薄膜 3 の微細ピッチの凹凸の凸部 5 で支持された多数の DNA 断片 7 が得られる。これらの多数の DNA 断片 7 は薄膜 3 の凸部に支持されているため、元の DNA での並びが保持されている。

【0039】

次いで図 4 に示すように、第 1 の基板 1 の表面側に第 2 の基板 8 を対向させた後、アブレーション層 2 の所望部位に第 1 の基板 1 の裏面側からレーザ光 9 を照射すると、アブレーション層 2 の対応部位 10 が加熱されて気化し、その膨張による力により薄膜 3 を DNA 断片 7 と共に飛ばして第 2 の基板 8 の表面に付着させる。

【0040】

本発明では、このようにして、元の DNA 4 の、所望の部位の DNA 断片 7 を第 1 の基板 1 の表面から第 2 の基板 8 の表面に捕捉することができ、こうして元の DNA 4 における位置が分かる所望の部位の DNA 断片 7 を確実に回収して塩



基配列の解析に供することができる。

【0041】

以上のような解析を、伸長して薄膜3に固定したDNA4の一端側から他端側に対応して順次行うことにより、DNA4の全塩基配列を解析することができる。

【0042】

本発明においては、DNA4等の切断に酵素を用いているため、DNA断片7の両端の分子構造は明確に定義されており、従って、その両端に既知配列のDNAをライゲーションさせて、既知配列に対するプライマーを用いてPCR法により増幅したり、あるいはDNA断片7を自己環状化させてローリングサークル法により増幅したりすることを容易に行うことができる。

【0043】

尚、第2の基板8は、第1の基板1と同様に板状の構成とする他、フィルム状の構成とすることもできる。また上記のDNA断片7の捕捉動作を第2の基板8又は第1の基板1を移動させながら行うことにより、元のDNAの全塩基配列を順次解析することも可能である。

【0044】

以上に説明した実施の形態では、DNA固定用の薄膜3は、微細ピッチの凹凸を形成した薄膜として構成しているが、他の実施の形態として、この薄膜3としては、高分子ゲルにより形成した薄膜を適用することができる。

即ち、高分子ゲルは、多量の水を包含する網目状の構造を持つので、その網目構造によりDNA分子を固定しても、DNAの大部分は水中に存在するため、酵素が作用する際の障害とならない。

【0045】

但し、高分子ゲルの薄膜上にDNAを伸長して固定した場合には、微細ピッチの凹凸を有する薄膜のように、凹凸のピッチに対応した切断は行えない。しかしながら、この場合には、DNAの切断に制限酵素を用いれば良い。

【0046】

例えば、4塩基の並びを認識して切断を行う4ベースカッターと称される制限

酵素を用いれば、4種類の塩基（A，T，G，C）に対応して、平均して $44=256$ 塩基毎に1個所、従って塩基間の間隔は 0.34 nm であることから、 $0.34\times 256=87\text{ nm}$ 毎に切断がされることになる。また6塩基の並びを認識して切断を行う6ベースカッターを用いれば、 $0.34\times 46=1.4\mu\text{ m}$ 毎に切断がされることになる。こうして、微細ピッチの凹凸を有する薄膜によりDNAを所望の長さの断片に切断したのと同等の切断を行うことができる。

【0047】

次に上記の実施の形態では、第1の基板1と塩基配列解析試料固定用の薄膜3との間にアブレーション層2を介在させ、このアブレーション層2を加熱して気化させることにより、その部位に対応するDNA断片7を薄膜3と共に第1の基板1から飛ばして第2の基板8表面に捕捉するようにしているが、他の実施の形態として、アブレーション層2を省略し、薄膜3自体を加熱により気化させることによりDNA断片7を飛ばすようにすることもできる。

【0048】

またアブレーション層2には、加熱により気化する材料に加えて、ビーム吸収性の材料を含ませることができる。ビーム吸収性の材料としては、例えばレーザー加工におけるビーム吸収剤として使用されるカーボンを用い、これを加熱により気化する材料と第1の基板1の間に蒸着してコーティングすれば、レーザー光のビームを効率的に吸収して、プラスチック等の加熱により気化する材料を効率的に加熱して気化させることができる。

【0049】

しかしながら加熱手段としてレーザー光照射を適用する場合においても、加熱により気化させる材料と、レーザー光の波長を適宜に選択すれば、ビーム吸収性の材料を用いずに、効率的に加熱して気化させることもできる。

【0050】

また、上記の実施の形態では、アブレーション層2を加熱する手段をレーザー照射としているが、この他の実施の形態として、予め第1の基板1に通電加熱体を配置しておき、この通電加熱体に通電することによりアブレーション層2の所望部位、又は薄膜3自体を加熱するようにすることができる。

【0051】

【発明の効果】

本発明は以上のとおりであるので、DNAやRNAの塩基配列解析において、次のような効果がある。

a. 塩基配列を損なうことなく効率良くDNA等の塩基配列解析試料を切断し、所望の位置の断片を確実に回収して塩基解析に供することができる。

b. 塩基配列解析試料の断片の回収を、元の塩基配列解析試料の一端側から他端側に順次行うことにより、DNA等の塩基配列解析試料の全塩基配列の解析を行うことが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 第1の基板の表面にDNA等の塩基配列解析試料固定用の薄膜を形成して、この薄膜上にDNAを伸長して固定した状態を示す平面図である。

【図2】 図1の一部拡大A-A断面図である。

【図3】 動作の進行した、ある局面の状態を示す図1のA-A断面図である。

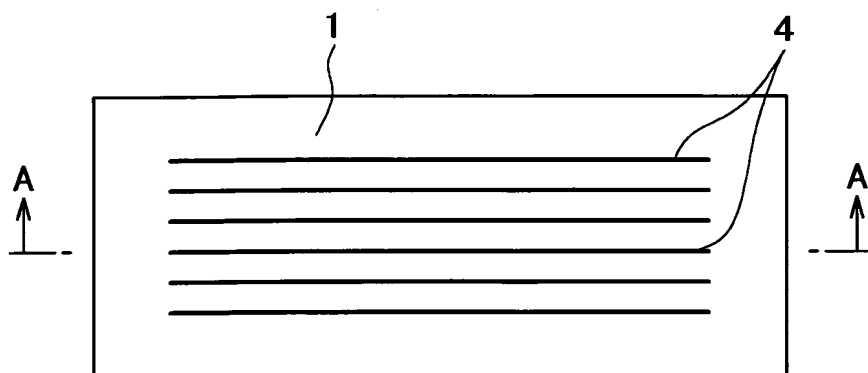
【図4】 動作の進行した、他のある局面の状態を示す図1のA-A断面図である。

【符号の説明】

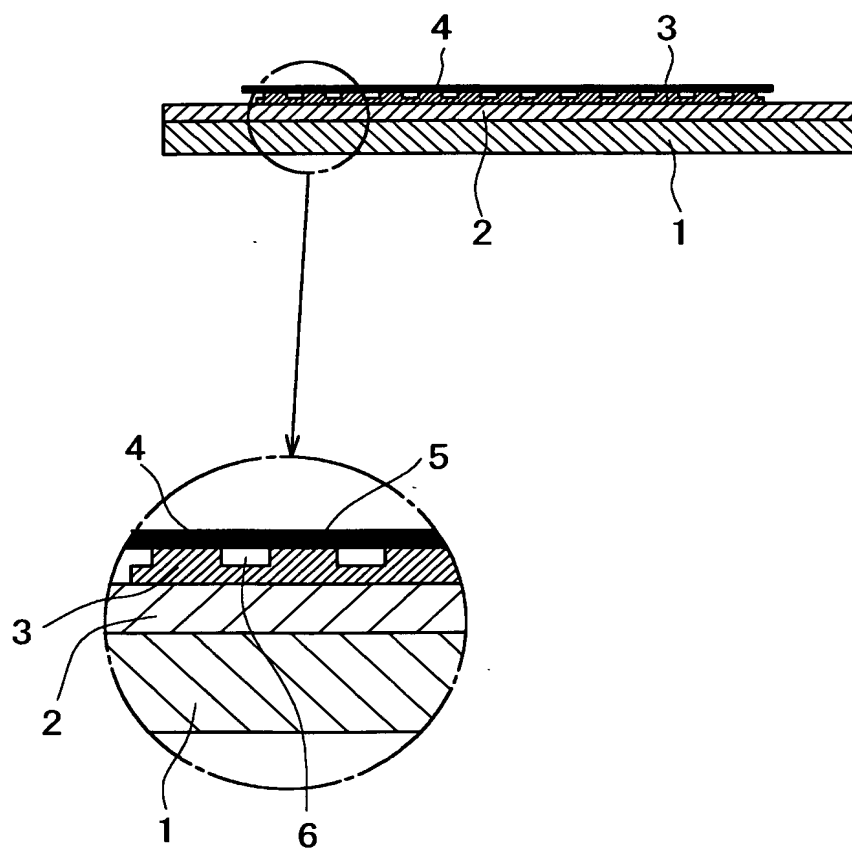
1	第1の基板
2	アブレーション層
3	DNA等の塩基配列解析試料固定用の薄膜
4	DNA
5	凸部
6	凹部
7	DNA断片
8	第2の基板
9	レーザー光
10	対応部位

【書類名】 図面

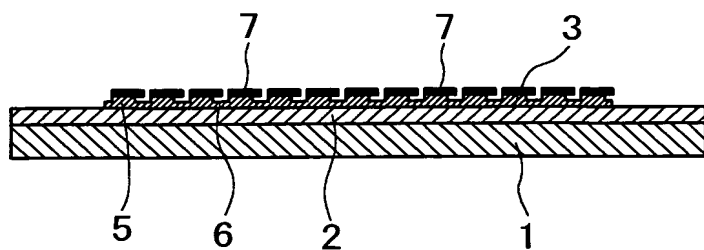
【図 1】



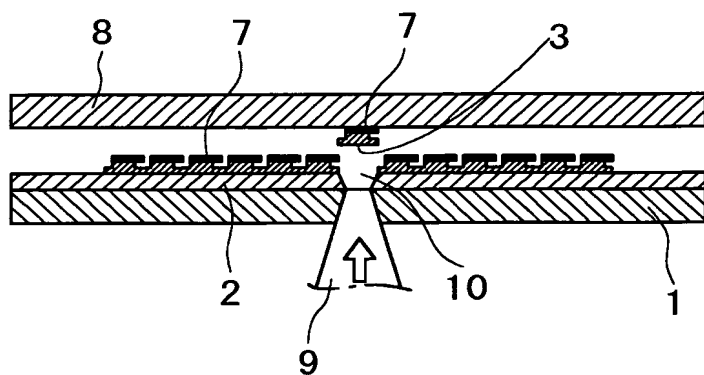
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

DNAを伸長し配列して基板上に固定し、一端より順次断片に切断して回収し、各々の断片を解析した後、解析結果をつなぎ合わせて、元のDNAの全塩基配列を決定する方法が提案されているが、これを適用するためには、元の塩基配列を損なうことなく効率良くDNA断片を回収する手法が必要になる。

【解決手段】

そこで本発明では、第1の基板1の表面に塩基配列解析試料固定用の薄膜3を形成して、この薄膜上に塩基配列解析試料4を伸長して固定し、この状態で塩基配列解析試料を酵素により切断して断片化した後、所望の部位の薄膜を加熱手段により加熱して気化させることにより、所望の部位の断片7を第1の基板表面から飛ばして、この第1の基板の表面側に対向して配置した第2の基板8表面に捕捉し、この状態で塩基配列を解析する塩基配列解析方法を提案している。

【選択図】 図4

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 1 4 3 3 3
受付番号	5 0 2 0 1 6 3 1 7 9 0
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 4 年 1 0 月 3 0 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年10月29日

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成16年 2月25日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2002-314333
 【出願日】 平成14年10月29日提出の特許願
【承継人】
 【識別番号】 501203344
 【氏名又は名称】 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
【承継人代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【承継人代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【その他】 独立行政法人農業技術研究機構法の一部を改正する法律（平成14年12月4日法律第129号）附則第4条第1項に基づく承継。（なお、国が承継する資産についての政令は定めていない。）

【提出物件の目録】
 【物件名】 委任状 1

【事件の表示】
【発明の名称】 塩基配列解析方法及び装置

【物件名】

委任状

委 任 状

平成 16 年 2 月 25 日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志
識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲
を以て代理人として下記事項を委任します。

別添一覧表に記載の名義変更及び特許権移転登録申請に関する手続

住所又は居所 茨城県つくば市観音台3-1-1

氏名又は名称 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

代表者 理事長 三輪 春太郎



2

出願番号	発明の名称	出願日
特願平 10-61889 号	融合細胞株とその取得方法	1998/2/27
特願 2003-353137	融合細胞株	2003/10/14
特願 2000-574251	薬物代謝機能を持つ植物及びその用途	1999/3/26
特願平 10-310927 号	高純度 β -クリプトキサンチンの製造方法	1998/10/30
特願平 10-346646 号	抗アレルギー剤	1998/11/20
特願平 10-287999 号	環境ストレス耐性植物	1998/10/9
特願 2000-620104	アブシジン酸合成を制御する新規イネ遺伝子	2001/11/20
特願 2000-620098	エチレン合成を制御する新規イネ遺伝子	2001/11/20
特願 2000-620081	雌しべの各組織に特異的な活性を有するプロモーター	2001/11/20
特願 2001-535562	植物の感光性遺伝子およびその利用	2002/4/4
特願 2001-535563	植物の感光性遺伝子 Hd1 およびその利用	2002/4/4
特願平 11-330680 号	タバート層特異的ジंकフィンガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法	1999/11/19
特願 2002-234201	タバート層特異的ジंकフィンガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2002/8/9
特願 2003-110911	タバート層特異的ジंकフィンガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2003/4/15
特願平 11-330681 号	花粉特異的ジंकフィンガー転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法	1999/11/19
特願 2002-234207	花粉特異的ジंकフィンガー転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2002/8/9
特願 2003-110912	花粉特異的ジंकフィンガー転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2003/4/15
特願 2000-41704	活性化酵素の不活性化方法	2000/2/18
特願 2000-071533	人工シャペロン用キット	2000/3/15
特願 2000-83067	葉の形状を制御する新規イネ遺伝子	2000/3/23
特願 2000-149106	ブラシノステロイド応答に関与する新規遺伝子	2000/5/19
特願 2000-195672	抗アレルギー剤	2000/6/29
特願 2000-266083	ベクターモノカリオンを用いた紫紋羽病菌に対する新規な	2000/9/1
特願 2000-251606	外来遺伝子産物を植物の種子中に高度に蓄積させる方法	2000/8/22
特願 2000-286097	耐暑性の向上した形質転換植物及びその作出方法	2000/9/20
特願 2000-316330	近赤外分光法を用いた血液分析法および血液分析装置	2000/10/17
特願 2000-316331	近赤外分光法を用いた液状試料の分析法および分析装置	2000/10/17
特願 2000-313577	マイクロスフィアの製造方法および製造装置	2000/10/13
特願 2000-311295	イネ貯蔵タンパク質の発現を制御する bz1P 型転写因子	2000/10/11

3

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2000-347924	動物の受精卵の共培養担体及びこの担体を用いる動物の受精卵の培養方法	2000/11/15
特願 2000-005221	プロリン分解系の抑制により植物のストレス耐性を上昇させる方法	2000/1/5
特願 2000-356839	植物の開花を誘導する遺伝子Hd3a およびその利用	2000/11/24
特願 2000-330642	MADS ボックス遺伝子を標的とした植物の花型の改良	2000/10/30
特願 2001-16569	病原性低下因子を含む白紋羽病菌分離株W370	2001/1/25
特願 2001-50208	豚回虫感染幼虫(<i>Ascaris suum</i>)の14KDa 抗原、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2001/2/26
特願 2001-134453	新規遺伝子	2001/5/1
特願 2002-216303	舌上皮前駆細胞の単離培養方法およびその分化誘導方法	2002/7/25
特願 2001-239980	塩ストレス耐性を制御する新規イネ遺伝子	2001/8/7
特願 2003-539411	フィトクロムCの発現制御による植物の開花時期の調節	2003/9/9
特願 2001-266001	単分散複合型エマルションの製造方法	2001/9/3
特願 2001-273689	米のDNA食味判定技術及び粳/玄米半粒による良食味米選抜方法	2001/9/10
特願 2001-277332	スターチンターゼ I 型の機能解明と新規デンプン作出法	2001/9/12
特願 2001-284927	カイコ卵へのポリヌクレオチドの効率的導入方法	2001/9/19
特願 2001-285663	休眠卵を産生するカイコ品種へのポリヌクレオチドの導入方法	2001/9/19
特願 2001-284786	抗パピルソウイルス剤	2001/9/19
特願 2002-00796	豚回虫(<i>Ascaris suum</i>)感染幼虫の16KDa 抗原、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2002/1/7
特願 2002-28109	種子成熟後期及び発芽期特異的誘導生プロモーター	2002/2/5
特願 2002-145183	ブラシノリド応答性遺伝子およびその利用	2002/5/20
特願 2002-151627	病害抵抗性反応を制御する新規遺伝子とその利用	2002/5/24
特願 2002-153807	植物の開花時期を促進する Bhd1 遺伝子およびその利用	2002/5/28
特願 2002-216112	DNA脱塩基部位の検出方法	2002/7/24
特願 2002-243551	寄生虫の無機ピロホスファターゼ、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2002/8/23
特願 2002-252606	植物の開花促進遺伝子 RFT1 および植物の開花時期を予測する方法	2002/8/30
特願 2002-276051	新たな機能を持つジベレリン 2-酸化酵素遺伝子およびその利用	2002/9/20
特願 2002-276398	ブラシノステロイドの生合成に関与しているシトクロムP450モノオキシゲナーゼ遺伝子の改変および/または過剰発現による単子葉植物の形質の制御方法およびこの遺伝子を用いて改変された単子葉植物	2002/9/20

4

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2002-289848	DNAの伸長固定方法	2002/10/2
特願 2002-289855	DNAを伸長、固定する方法	2002/10/2
特願 2002-301454	カイコを利用したタンパク質の製造方法	2002/10/16
特願 2002-301503	ウニ由来インスレーターを用いた遺伝子発現ベクター	2002/10/16
特願 2002-376108	DNA配列情報解析法	2002/12/26
特願 2003-053023	種子の休眠を維持する方法	2003/2/28
特願 2003-054495	マダニのビロプラズマ原虫殺虫ペプチドタンパク質、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2003/2/28
特願 2003-60615	ゲノムDNAの標的メチル化領域の脱メチル化法	2003/3/6
特願 2003-067173	部位特異的組換え酵素遺伝子の一過性発現によるマーカー遺伝子の除去技術	2003/3/12
特願 2003-067262	UVDE 発現による相同組換え頻度の向上	2003/3/12
特願 2003-092465	未分化細胞を選別する方法およびその利用	2003/3/28
特願 2003-098516	舌上皮由来細胞株KT-1及びその用途	2003/4/1
特願 2003-154226	アセチルコリンエステラーゼ活性を有するタンパク質、その精製方法および遺伝子	2003/5/30
特願 2001-35632	カタルピック酸及びまたはブニシク酸の合成に関する遺伝子	2001/2/13
特願 2001-174553	ブロン蓄積能力の高いイネ科植物およびその製造方法	2001/6/8
特願 2002-30555	植物の耐干性の簡易評価法	2002/2/7
特願 2002-53281	光スキャニング装置	2002/2/28
特願 2002-53282	微小領域光処理装置	2002/2/28
特願 2002-215940	中枢神経細胞突起再生剤及びその生理作用を有する高機能性製品	2002/7/25
特願 2002-223686	化学発光および蛍光の経時変化測定装置および方法	2002/7/29
特願 2002-271730	抗アレルギー成分を含有する機能性飲食品	2002/9/18
特願 2002-274742	人工漁場	2002/9/20
特願 2002-273438	trans-11-, cis-13-共役二重結合をもつ脂肪酸の合成に関与する遺伝子およびその利用	2002/9/19
特願 2002-294471	ダイヤフラムを用いフィルタ機能を有するバルブ	2002/10/8
特願 2002-297423	土壌病害防除剤および土壌病害防除法	2002/10/10
特願 2002-305907	土壌病害防除剤および土壌病害防除法	2002/10/21
特願 2002-305824	DNA の変異導入法	2002/10/21
特願 2002-305896	特性を改変した蛋白質の作出方法	2002/10/21
特願 2002-320576	耐熱性コージピオースホスホリラーゼ	2002/11/1

5

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2002-320569	高重合度オリゴ糖生成コージビオースホスホリラーゼ	2002/11/1
特願 2002-314333	塩基配列解析方法及び装置	2002/10/29
特願 2002-332090	植物の転写因子をコードする遺伝子	2002/11/15
特願 2002-347291	α -グルコシダーゼ遺伝子を含む有する組換えベクター、形質転換体およびそれを用いた該の製造方法	2002/11/29
特願 2002-349716	細胞培養用セル	2002/12/2
特願 2003-080847	ストレス誘導性プロモーター及びその利用方法	2003/3/24
特願 2002-380936	小麦粉の製パン性の改良法と本法で得られるパン類	2002/12/27
特願 2002-380937	超強力小麦粉含有改質米粉とそれを用いた米粉食品	2002/12/27
特願 2002-380938	米粉パンの製造法と本法によって得られるパン類	2002/12/27
特願 2002-18018	低カフェインの茶葉からの抗アレルギー成分含有機能性飲食品	2003/1/27
特願 2002-18017	茶葉を原料とした抗アレルギー作用を有する機能性食品素材	2003/1/27
特願 2002-18019	抗アレルギー効果増強製造法及び本法を用いて製造された機能性飲食品	2003/1/27
特願 2003-033732	結晶1-kestose製造に用いる β -フルクトフラノシダーゼの選抜法	2003/2/12
特願 2003-063181	スフィンゴ糖脂質の判別法	2003/3/10
特願 2003-067049	イネ由来のストレス誘導性プロモーター	2003/3/12
特願 2003-069917	重金属蓄積能が強化された植物体	2003/3/14
特願 2003-69067	時間分解蛍光偏光解消法による分析方法及び装置	2003/3/14
特願 2003-69034	細胞の処理に用いるセル	2003/3/14
特願 2003-89353	静電マイクロバルブ及びポンプ	2003/3/27
特願 2003-051882	酵素活性測定方法、その方法に用いる固相及びその製造方法、酵素阻害剤の阻害能評価方法、並びに酵素活性測定用キット	2003/2/27
特願 2003-92827	組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官の生産方法及び新規組換えタンパク質	2003/3/28
特願 2003-124823	trans-11-, cis-13-共役二重結合をもつ脂肪酸の合成に関与する遺伝子およびその利用	2003/4/30
特願 2003-111246	新規 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子	2003/4/16
特願 2003-224863	発泡ガラス製造方法	2002/8/1
特願 2001-587156	レタスピッグベインウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用	2002/11/11
特願 2001-152679	植物の Ran 遺伝子変異体、および該変異体を用いた植物の開花時期の促進方法	2001/05/22

7

特許名	特許番号	出願番号
昆虫由来のセルラーゼ遺伝子	特許第 3030349 号	特願平 9-206740 号
細胞壁溶解酵素遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 2997800 号	特願平 9-343630 号
キシリナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3366933 号	特願平 10-90702 号
マイクロスフィアの連続製造装置	特許第 3081880 号	特願平 10-083946 号
糸状菌及び細菌に対する溶菌活性を有するイネキシナーゼ相補 DNA 及び該相補 DNA を含むプラスミドを保有する形質転換体	特許第 3376453 号	特願平 10-123905 号
オーラブテン高含有ミカン科植物の作出法	特許第 2963967 号	特願平 10-208473 号
マイクロチャネル装置及び同装置を用いたエマルションの製造方法	特許第 3012608 号	特願平 10-262849 号
クロスフロー型マイクロチャネル装置及び同装置を用いたエマルションの生成または分離方法	特許第 2981547 号	特許平 10-187345 号
植物の転写因子をコードする遺伝子	特許第 3183458 号	特願平 10-228457 号
環境ストレス耐性植物	特許第 3178572 号	特願平 10-292348 号
アミノペプチダーゼ前駆体をプロセッシングする酵素遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3030457 号	特願平 11-31118 号
単分散固体脂質マイクロスフィアの製造方法	特許第 3030364 号	特願平 11-78862 号
活性化リパーゼの製造方法および活性化リパーゼを用いた油脂の改質方法	特許第 3116060 号	特願平 11-78861 号
キシロースを生成しない改変キシナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3030331 号	特願平 11-071715 号
病原性が低い紫紋羽病菌菌株分離株 V-70 およびそれを含む紫紋羽病防除剤	特許第 260062 号	特願平 11-260062 号
ダイズグリシニンを発現するトランスジェニック植物	特許第 3030339 号	特願平 10-223897 号
機能性エマルション	特許第 3448006 号	特願 2000-90441 号
可視および近赤外領域のスペクトル情報による哺乳動物の血漿成分の迅速測定法	特許第 3407006 号	特願 2000-364327
新規ペプチド、血圧降下剤および生理活性物質	特許第 3032822 号	特願平 10-323678 号
植物の細胞増殖因子前駆体ポリペプチド、増殖因子前駆体ポリペプチドをコードする遺伝子、植物の増殖促進方法	特許第 3038381 号	特願平 11-079612 号
タバコ由来の誘導性プロモーター領域	特許第 3236890 号	特願平 11-251615 号
乳成分連続測定装置	特許第 3268449 号	特願平 11-272825 号
マツタケ菌根の迅速人工合成法	特許第 3263730 号	特願平 11-357439 号

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-314333
受付番号	20400390599
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	新井 裕善 7660
作成日	平成16年 4月27日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】 501203344

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台3-1-1

【氏名又は名称】 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

特願 2 0 0 2 - 3 1 4 3 3 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 9 5 5 6 8]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 5 月 1 5 日
[変更理由] 住所変更
住 所 埼玉県さいたま市日進町 1 丁目 4 0 番地 2
氏 名 生物系特定産業技術研究推進機構
2. 変更年月日 2 0 0 3 年 4 月 2 2 日
[変更理由] 住所変更
住 所 埼玉県さいたま市北区日進町 1 丁目 4 0 番地 2
氏 名 生物系特定産業技術研究推進機構

特願 2 0 0 2 - 3 1 4 3 3 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 3 8 2 0 0]

1. 変更年月日 1 9 9 3 年 1 0 月 1 8 日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都渋谷区神宮前 3 丁目 1 番 1 4 号

氏 名 株式会社モリテックス

特願 2002-314333

出願人履歴情報

識別番号 [501203344]

1. 変更年月日 2001年 5月22日
[変更理由] 新規登録
住 所 茨城県つくば市観音台3-1-1
氏 名 独立行政法人 農業技術研究機構
2. 変更年月日 2003年10月 1日
[変更理由] 名称変更
住 所 茨城県つくば市観音台3-1-1
氏 名 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
3. 変更年月日 2006年 4月 5日
[変更理由] 名称変更
住 所 茨城県つくば市観音台3-1-1
氏 名 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

(Translation)

PATENT OFFICE

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this office.

Date of application: October 29, 2002

Application Number. No. 2002-314333

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris convention, is JP2002-314333.

Applicant: National Agriculture and Bio-oriented
Research Organization

Applicant: Moritex Corporation

July 11, 2006

Makoto Nakajima
Commissioner, Patent Office

Application Section
Patent

Certificate

No. 2006-3025098x

(Translation)

Patent Application No. 2002-314333

[Name of document] Patent Application
[Reference Number] MT2OCT01
[Submitted to] Director General of the Japanese Patent Office
[International Patent Classification] G01N 33/50

[Inventor]

[Address] c/o Moritex Corporation, Yokohama Technical center
Azamino Minami 1-3-3, Aoba-Ku, Yokohama city,
Kanagawa Pref., Japan

[Name] Koji Horio

[Inventor]

[Address] President Heights 711, 23-9, Nezu 1-chome,
Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

[Name] Masao Washizu

[Inventor]

[Address] 25-19-205, Hitotsuya, 3-chome,
Adachi-ku, Tokyo, Japan

[Name] Osamu Kurosawa

[Patent Applicant]

[Identification Number] 000195568

[Name] National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

[Patent Applicant]

[Identification Number] 000138200

[Name] Moritex Corporation

[Name of representative] Yuko Morito

[Attorney]

[Identification Number] 100071102

[Patent Attorney]

[Name] Koji MITSUHASHI

[Statement of Fee]

[Prepayment register Number] 013332

[Amount of payment] ¥21000

[List of things submitted]

[Name of thing] One specification
[Name of thing] One set of drawings
[Name of thing] One abstract
[Necessity of proof] Necessary

Application Certificate
No.2006-3025098

[Title of the document] Specification

[Title of the invention] Method and apparatus for determining
a base sequence

[Claims]

[Claim 1] A method for determining a base sequence, comprising the steps of forming a thin film for immobilizing a base sequence test sample, on the front surface of a first board; elongating and immobilizing a base sequence test sample on the thin film; cutting the base sequence test sample in this state into fragments by means of an enzyme; heating and vaporizing the thin film in a desired region by a heating means, to shoot the fragment of the base sequence test sample in the desired region from the front surface of the first board, in order that the fragment can be arrested on the front surface of a second board disposed in opposite to the front surface of the first board; and determining the base sequence in this state.

[Claim 2] A method for determining a base sequence, comprising the steps of forming a thin film for immobilizing a base sequence test sample, on an ablation layer containing a material capable of being vaporized by heating, formed on the front surface of a first board; elongating and immobilizing a base sequence test sample on the ablation layer; cutting the base sequence test sample in this state into fragments by means of an enzyme;

heating and vaporizing the ablation layer in a desired region by a heating means, to shoot the fragment of the base sequence test sample in the desired region from the front surface of the first board, in order that the fragment can be arrested on the front surface of a second board disposed in opposite to the front surface of the first board; and determining the base sequence in this state.

[Claim 3] A method for determining a base sequence, characterized in that the base sequence determination as set forth in claim 1 or 2 is carried out sequentially fragment by fragment from one end toward the other end of the elongated and immobilized base sequence test sample, to determine the entire base sequence of the base sequence test sample.

[Claim 4] A method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample is a polymeric gel.

[Claim 5] A method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample has depressions and projections formed at a very small pitch.

[Claim 6] A method for determining a base sequence, according to claim 5, wherein the material of the thin film is polymethyl methacrylate (PMMA).

[Claim 7] A method for determining a base sequence, according

to claim 5, wherein the pitch is in a range of 0.1 μm to 10 μm .

[Claim 8] A method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the heating means is laser beam irradiation from the back surface of the first board.

[Claim 9] A method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the heating means is an electric heater pre-formed in the first board.

[Claim 10] A method for determining a base sequence, according to claim 2, wherein the material capable of being vaporized by heating, contained in the ablation layer, is plastic.

[Claim 11] A method for determining a base sequence, according to claim 2, wherein in the case where laser beam irradiation from the back surface of the first board is used as the heating means, the ablation layer contains a beam-absorbable material, in addition to the material capable of being vaporized by heating.

[Claim 12] A method for determining a base sequence, according to claim 11, wherein the beam-absorbable material is carbon.

[Claim 13] A method for determining a base sequence, according to claim 11 or 12, wherein the beam-absorbable material is vapor-deposited between the material capable of being vaporized by heating and the first board.

[Claim 14] An apparatus for determining a base sequence, comprising a first board having a thin film formed on its front

surface for allowing a base sequence test sample to be elongated and immobilized on the thin film; a heating means for heating and vaporizing the thin film in a desired region; and a second board disposed in opposite to the front surface of the first board.

[Claim 15] An apparatus for determining a base sequence, comprising a first board having a thin film formed on an ablation layer containing a material capable of being vaporized by heating, formed on the front surface of the first board, for allowing a base sequence test sample to be elongated and immobilized on the ablation layer; a heating means for heating and vaporizing the ablation layer in a desired region; and a second board disposed in opposite to the front surface of the first board.

[Claim 16] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15, wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample is a polymeric gel.

[Claim 17] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15, wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample has depressions and projections formed at a very small pitch.

[Claim 18] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 17, wherein the material of the thin film is polymethyl methacrylate (PMMA).

[Claim 19] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 17, wherein the pitch is in a range of 0.1 μm to 10 μm .

[Claim 20] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15, wherein the heating means is laser beam irradiation from the back surface of the first board.

[Claim 21] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15, wherein the heating means is an electric heater pre-formed in the first board.

[Claim 22] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 15, wherein the material capable of being vaporized by heating, contained in the ablation layer is plastic.

[Claim 23] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 15, wherein in the case where laser beam irradiation from the back surface of the first board is used as the heating means, the ablation layer contains a beam-absorbable material, in addition to the material capable of being vaporized by heating.

[Claim 24] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 23, wherein the beam-absorbable material is carbon.

[Claim 25] An apparatus for determining a base sequence, according to claim 23 or 24, wherein the beam-absorbable

material is vapor-deposited between the material capable of being vaporized by heating and the first board.

[Detailed description of the invention]

[0001]

[Technical field to which the invention pertains]

The present invention relates to a method and apparatus for determining the base sequence of DNA or RNA.

[0002]

[Prior art]

A conventional base sequence analyzer for determining the base sequence of a base sequence test sample such as DNA can determine hundreds of base pairs to one thousand base pairs at a time. Therefore, in the even of analyzing a base sequence test sample far longer than such numbers of base pairs, the base sequence test sample is at first cut into fragments in an aqueous solution using a restriction enzyme, and the fragments are analyzed using said base sequence analyzer.

[0003]

The method of fragmenting a base sequence test sample such as DNA in an aqueous solution using a restriction enzyme has a disadvantage that the regions the analyzed fragments of the test sample had occupied in the original test sample become unknown.

[0004]

Therefore, the conventional practice is such that many different restriction enzymes are used to analyze the respective fragments, and that the analyzed results are connected to estimate the entire base sequence. However, this method has such disadvantages that the analysis per se using many different restriction enzymes requires enormous labor and cost, and, in addition, that the work of connecting analyzed results for estimating the entire sequence also requires enormous labor. The disadvantages become more remarkable when a base sequence test sample such as DNA is longer.

[0005]

To overcome the disadvantages, for example, the invention of Patent No. 3282679 proposes a method comprising the steps of elongating, arranging and immobilizing DNA on a board, cutting it sequentially from one end into fragments each consisting of hundreds of base pairs to one thousand base pairs, recovering them, analyzing the respective fragments, and connecting the analyzed results, for determining the entire base sequence of the original DNA.

[0006]

[Problem to be solved by the invention]

For practical application of this method, required is a method for efficiently cutting a base sequence test sample such as DNA into fragments without disturbing the base sequence, and

recovering the fragments.

The object of the present invention is to provide a method and apparatus for efficiently cutting and recovering a base sequence test sample such as DNA.

[0007]

[Means for solving the problem]

To solve the above-mentioned problem, the subject matter of claim 1 proposes a method for determining a base sequence, comprising the steps of forming a thin film for immobilizing a base sequence test sample, on the front surface of a first board; elongating and immobilizing a base sequence test sample on the thin film; cutting the base sequence test sample in this state into fragments by means of an enzyme; heating and vaporizing the thin film in a desired region by a heating means, to shoot the fragment of the base sequence test sample in the desired region from the front surface of the first board, in order that the fragment can be arrested on the front surface of a second board disposed in opposite to the front surface of the first board; and determining the base sequence in this state.

[0008]

The subject matter of claim 2 proposes a method for determining a base sequence, comprising the steps of forming a thin film for immobilizing a base sequence test sample, on

an ablation layer containing a material capable of being vaporized by heating, formed on the front surface of a first board; elongating and immobilizing a base sequence test sample on the ablation layer; cutting the base sequence test sample in this state into fragments by means of an enzyme; heating and vaporizing the ablation layer in a desired region by a heating means, to shoot the fragment of the base sequence test sample in the desired region from the front surface of the first board, in order that the fragment can be arrested on the front surface of a second board disposed in opposite to the front surface of the first board; and determining the base sequence in this state.

[0009]

The subject matter of claim 3 proposes a method for determining a base sequence, characterized in that the base sequence determination as set forth in claim 1 or 2 is carried out sequentially fragment by fragment from one end toward the other end of the elongated and immobilized base sequence test sample, to determine the entire base sequence of the base sequence test sample.

[0010]

The subject matter of claim 4 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample is

a polymeric gel.

[0011]

The subject matter of claim 5 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample has depressions and projections formed at a very small pitch.

[0012]

The subject matter of claim 6 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 5, wherein the material of the thin film is polymethyl methacrylate (PMMA).

[0013]

The subject matter of claim 7 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 5, wherein the pitch is in a range of 0.1 μm to 10 μm .

[0014]

The subject matter of claim 8 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the heating means is laser beam irradiation from the back surface of the first board.

[0015]

The subject matter of claim 9 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 1 or 2, wherein the heating means is an electric heater pre-formed in the first board.

[0016]

The subject matter of claim 10 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 2, wherein the material capable of being vaporized by heating, contained in the ablation layer, is plastic.

[0017]

The subject matter of claim 11 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 2, wherein in the case where laser beam irradiation from the back surface of the first board is used as the heating means, the ablation layer contains a beam-absorbable material, in addition to the material capable of being vaporized by heating.

[0018]

The subject matter of claim 12 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 11, wherein the beam-absorbable material is carbon.

[0019]

The subject matter of claim 13 proposes a method for determining a base sequence, according to claim 11 or 12, wherein the beam-absorbable material is vapor-deposited between the material capable of being vaporized by heating and the first board.

[0020]

The subject matter of claim 14 proposes an apparatus for

determining a base sequence, comprising a first board having a thin film formed on its front surface for allowing a base sequence test sample to be elongated and immobilized on the thin film; a heating means for heating and vaporizing the thin film in a desired region; and a second board disposed in opposite to the front surface of the first board.

[0021]

The subject matter of claim 15 proposes an apparatus for determining a base sequence, comprising a first board having a thin film formed on an ablation layer containing a material capable of being vaporized by heating, formed on the front surface of the first board, for allowing a base sequence test sample to be elongated and immobilized on the ablation layer; a heating means for heating and vaporizing the ablation layer in a desired region; and a second board disposed in opposite to the front surface of the first board.

[0022]

The subject matter of claim 16 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15, wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample is a polymeric gel.

[0023]

The subject matter of claim 17 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15,

wherein the thin film for immobilizing a base sequence test sample has depressions and projections formed at a very small pitch.

[0024]

The subject matter of claim 18 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 17, wherein the material of the thin film is polymethyl methacrylate (PMMA).

[0025]

The subject matter of claim 19 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 18, wherein the pitch is in a range of 0.1 μm to 10 μm .

[0026]

The subject matter of claim 20 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15, wherein the heating means is laser beam irradiation from the back surface of the first board.

[0027]

The subject matter of claim 21 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 14 or 15, wherein the heating means is an electric heater pre-formed in the first board.

[0028]

The subject matter of claim 22 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 15, wherein the

material capable of being vaporized by heating, contained in the ablation layer is plastic.

[0029]

The subject matter of claim 23 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 15, wherein in the case where laser beam irradiation from the back surface of the first board is used as the heating means, the ablation layer contains a beam-absorbable material, in addition to the material capable of being vaporized by heating.

[0030]

The subject matter of claim 24 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 23, wherein the beam-absorbable material is carbon.

[0031]

The subject matter of claim 25 proposes an apparatus for determining a base sequence, according to claim 23 or 24, wherein the beam-absorbable material is vapor-deposited between the material capable of being vaporized by heating and the first board.

[0032]

According to this invention, a thin film for immobilizing a base sequence test sample is formed on the front surface of a first board, and a base sequence test sample such as DNA is elongated and immobilized on the thin film. In this state, an

enzyme is used to cut the base sequence test sample. Therefore, after cutting, the fragments of the base sequence test sample remain immobilized on the thin film and placed in the order, in which they had been arranged in the original base sequence test sample. Furthermore, since a restriction enzyme is used for the cutting, the molecular structures remain clearly still after cutting.

[0033]

Subsequently, the thin film for immobilizing a base sequence test sample or the ablation layer interposed between the thin layer and the first board is heated and vaporized in a desired region by a heating means such as laser beam irradiation or electric heater, to shoot the fragment of the base sequence test sample in the heated region, in order that the fragment can be arrested on the front surface of a second board. Therefore, the fragment of the base sequence test sample in the desired region can be reliably recovered for determining the base sequence.

[0034]

This determination can be carried out fragment by fragment sequentially from one end toward the other end of the base sequence test sample elongated and immobilized on the thin layer, to determine the entire base sequence of the test sample such as DNA.

[0035]

If the thin film used for immobilizing the base sequence test sample is a polymeric gel or is made of a material such as PMMA having depressions and projections formed at a very small pitch of, for example, 0.1 to 10 μm , it does not disturb the cutting by means of a restriction enzyme, and still after cutting, the immobilized state can be kept.

[0036]

[Modes for carrying out the invention]

Modes for carrying out the invention are described below in reference to Figs. 1 to 4.

Fig. 1 is a plan view showing a state, in which a thin film for immobilizing a base sequence test sample such as DNA is formed on the front surface of a first board, and in which a base sequence test sample is elongated and immobilized on the thin film. Fig. 2 is a partially enlarged A-A sectional view of Fig. 1. Figs. 3 and 4 are A-A sectional views of Fig. 1, showing states of certain phases.

In the drawings, symbol 1 denotes a first board, and as described later, the first board 1 is made of a light-transmitting material allowing the transmission of a laser beam. On the front surface of the first board 1, an ablation layer 2 is formed, and furthermore a thin film 3 for immobilizing a base sequence test sample is formed on the

ablation layer 2. The ablation layer 2 is made of a plastic material capable of being vaporized by heating such as polyethylene, polymethyl methacrylate or carbonate. The thin film 3 is formed by processing a material such as polymethyl methacrylate by such a means as photolithography or micro-molding, to have depressions and projections formed at an adequate very small pitch in a range of 0.1 to 10 μ .

[0037]

In the above-mentioned constitution, as shown in Figs. 1 and 2, a base sequence test sample, for example, DNA 4 is elongated and immobilized on the thin film 3. For elongating the DNA 4 and immobilizing it on the thin film 3, for example as described in Patent No. 3064001, the DNA in a solution can be electrostatically oriented and elongated, and the flow of the solution can be used for allowing the DNA to be deposited and immobilized. Any other adequate elongating and immobilizing method can also be used.

[0038]

If a DNA restriction enzyme is made to act on the DNA 4 attached to the projections 5 among the depressions and projections formed at a very small pitch on the thin film 3, the enzyme does not act on the DNA 4 attached to and immobilized on the projections 5. So, the DNA in the regions is not cut. However, since the enzyme acts on the DNA 4 existing over

depressions 6, the DNA in the regions is cut. Therefore, as shown in Fig. 3, numerous DNA fragments 7 are obtained as supported on the projections 5 among the depressions and projections formed at a very small pitch on the thin film 3. Since the numerous DNA fragments 7 are supported on the projections of the thin film 3, they are placed in the same order as in the original DNA.

[0039]

Then, as shown in Fig. 4, a second board 8 is brought to face the front surface of the first board 1, and the ablation layer 2 is irradiated with a laser beam 9 in a desired region from the back surface of the first board. As a result, the ablation layer 2 is heated and vaporized in the corresponding region 10, and its expanding force shoots the corresponding fragment of the thin layer 3 together with the DNA fragment 7, to let them adhere to the front surface of the second substrate 8.

[0040]

In this invention, the DNA fragment 7 in the desired region of the original DNA 4 can be sent from the front surface of the first board 1 and arrested on the front surface of the second board 8 as described above. In this way, the DNA fragment 7 of the desired region that can be identified in the original DNA 4 can be reliably recovered for determining its base

sequence.

[0041]

The above-mentioned determination can be carried out fragment by fragment sequentially from one end toward the other end of the DNA 4 elongated and immobilized on the thin film 3, to determine the entire base sequence of DNA 4.

[0042]

In this invention, since an enzyme is used for cutting DNA 4 or the like, the molecular structures at both the ends of each DNA fragment 7 are clearly defined. Therefore, other DNA fragments known in sequence can be easily ligated to both the ends of the DNA fragment 7, for PCR amplification using primers for the known sequences, or the DNA fragment 7 can also be easily self-cyclized for rolling circle amplification.

[0043]

The second board 8 can be a sheet like the first board 1, or can also be a film. The second board 8 or the first board 1 can also be moved while the DNA fragment 7 is being arrested, in order that the entire base sequence of the original DNA is determined fragment by fragment sequentially.

[0044]

In the above-mentioned mode, the thin film 3 for immobilizing DNA has depressions and projections formed at a very small pitch, but as another mode, a thin film composed of

a polymeric gel can also be used as the thin film 3.

A polymeric gel has a network structure containing much water. So even if the network structure is used to immobilize a DNA molecule, the action of an enzyme is not disturbed since most of the DNA exists in water.

[0045]

In the case where DNA is elongated and immobilized on a thin film made of a polymeric gel, cutting cannot be performed in relation with the pitch of depressions and projections unlike the thin film having depressions and projections formed at a very small pitch. In this case, it is only required to use a restriction enzyme for cutting DNA.

[0046]

For example, if a restriction enzyme called a 4-base cutter capable of recognizing 4-base sequence for cutting is used, cutting occurs every $4^4 = 256$ base pairs on the average in correspondence with four kinds of bases (A, T, G and C), hence every $0.34 \times 256 = 87$ nm, since the inter-base distance is 0.34 nm. Furthermore, if a 6-base cutter capable of recognizing 6-base sequence for cutting is used, cutting occurs every $0.34 \times 46 = 1.4$ μm . Thus, cutting can be carried out like the cutting of DNA into fragments with a desired length using a thin film having depressions and projections formed at a very small pitch.

[0047]

In the above-mentioned mode, the ablation layer 2 is interposed between the first board and the thin film 3 for immobilizing a base sequence test sample, and is heated and vaporized to shoot the DNA fragment 7 corresponding to the heated region together with the corresponding fragment of the thin film 3 from the first board, in order that they are arrested on the front surface of the second board. As another mode, the use of the ablation layer 2 can be avoided, and the thin film 3 per se can be heated and vaporized, to shoot the DNA fragment 7.

[0048]

The ablation layer 2 can contain a beam-absorbable material, in addition to the material capable of being vaporized by heating. As the beam-absorbable material, carbon used as a beam absorbent for example in laser processing can be used. If it is vapor-deposited between the material capable of being vaporized by heating and the first board, it can efficiently absorb a laser beam, to heat a plastic material or the like for efficiently heating and vaporizing the material to be vaporized by heating.

[0049]

However, also in the case where laser beam irradiation is used as the heating means, if the material capable of being vaporized by heating and the wavelength of the laser beam are

adequately selected, efficient heating and vaporization can be achieved even if the beam-absorbable material is not used.

[0050]

In the above-mentioned mode, laser beam irradiation is used as the means for heating the ablation layer 2, but as another mode, an electric heater can also be disposed beforehand in the first board 1, and energized for heating the ablation layer 2 or the thin layer 3 per se in a desired region.

[0051]

[Effects of the invention]

The present invention as described above provides the following effects in determining the base sequence of DNA or RNA.

- a. A base sequence test sample such as DNA can be efficiently cut without disturbing the base sequence, and fragments of desired regions can be reliably recovered and analyzed for determining the base sequence.
- b. If the fragments of a base sequence test sample are recovered sequentially from one end toward the other end of the original base sequence test sample, the entire base sequence of the test sample such as DNA can be determined.

[Brief description of the drawings]

[Fig. 1] is a plan view showing a state, in which a thin layer for immobilizing a base sequence test sample such as DNA is

formed on the surface of a first board, DNA being elongated and immobilized on the thin film.

[Fig. 2] is a partially enlarged A-A sectional view of Fig. 1.

[Fig. 3] is an A-A sectional view of Fig. 1, showing a state of a certain phase.

[Fig. 4] is an A-A sectional view of Fig. 1, showing a state of another phase.

[Meanings of symbols]

- 1 first board
- 2 ablation lation
- 3 thin film for immobilizing a base sequence test sample
such as DNA
- 4 DNA
- 5 projection
- 6 depression
- 7 DNA fragment
- 8 second board
- 9 laser beam
- 10 corresponding region

[Title of the document] Drawings

[Title of the document] Abstract

[Abstract]

[Problem to be solved]

Proposed is a method comprising the steps of elongating and arranging DNA while immobilizing it on a board, cutting it into fragments sequentially from one end, analyzing the respective fragments, connecting the analyzed results for determining the entire base sequence of the original DNA. For practically applying this method, required is a method of efficiently recovering DNA fragments without disturbing the original base sequence.

[Solution]

The present invention proposes a method for determining a base sequence, comprising the steps of forming a thin film 3 for immobilizing a base sequence test sample on the front surface of a first board 1; elongating and immobilizing a base sequence test sample 4 on the thin film; cutting the base sequence test sample in this state into fragments by means of an enzyme; heating and vaporizing the thin film in a desired region by a heating means, to shoot the fragment 7 of the base sequence test sample in the desired region from the front surface of the first board 1, in order that the fragment 7 can be arrested on the front surface of a second board 8 disposed in opposite to the front surface of the first board 1; and

determining the base sequence in this state.

[Selected Drawing] Fig. 4